

汞污染粮食诱导大鼠海马 c-FOS 蛋白表达

程金平¹, 王文华¹, 瞿丽雅², 贾金平¹, 郑敏³

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. 贵州省环境保护科学研究所, 贵阳 550002; 3. 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240)

摘要: 为了探讨我国典型汞污染地区汞污染生物效应, 并尝试应用即刻早期基因 c-fos 表达变化早期预报典型汞污染地区汞神经毒性的可行性, 本文应用免疫组织化学方法研究了实验粮食饲喂后, 大鼠海马 c-FOS 蛋白表达变化。结果表明污染粮食显著诱导大鼠海马 c-FOS 蛋白表达; 在饲喂过程中硒与汞有拮抗效应。初步推断, 即刻早期基因 c-fos 表达变化可以作为汞污染地区汞神经毒性检测和评价效应指标。

关键词: 汞污染粮食; c-fos; 基因表达; 海马; 早期预报

中图分类号: X18, Q523, R153.13 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0177-04

Expression of c-FOS Protein in Rat Hippocampus by Inducing of Mercury Contaminated Rice

CHENG Jin-ping¹, WANG Wen-hua¹, QU Li-ya², JIA Jin-ping¹, ZHENG Min³

(1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2. Guizhou Institute for Environmental Protection, Guiyang, 550002, China; 3. School of Life Science and Technology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In order to probe into the biological effects of mercury in typical mercury contaminated area and try to apply the expression of immediately early gene c-fos in brain to early predict the neurotoxicity of mercury in typical polluted areas, the expression of c-FOS protein in rat hippocampus is observed using immunocytochemical methods. The results show the mercury pollutes rice induced significantly the expression of c-FOS protein in hippocampus; the antagonism between selenium and mercury on the exposure process. It is suggested that c-fos can be used as an effective index of detecting and assessing neurotoxicology of mercury polluted areas.

Key words: mercury contaminated rice; c-fos; gene expression; hippocampus; early prediction

国内外研究者已经对贵州汞污染状况进行了调查。^[1~5]本课题组曾以贵州汞矿冶炼厂为中心, 于 2002 年对该矿区进行了初步调查^[6], 通过研究发现, 该地区水、土、气环境介质样品中以及农作物、植物和动物体中的汞含量, 多数都超过了国家标准及对照地区, 有的超出幅度为 2~3 个数量级。因此, 探讨上述污染对当地居民健康的影响及其危害评价, 是本论文研究的出发点。

海马是与学习记忆密切相关的重要脑区, c-fos 与学习记忆调控的研究倍受关注。本文采用贵州万山矿区实验田大米和清镇化工厂实验田大米对大鼠进行饲喂, 了解在该饲喂条件下, 大鼠海马中 c-FOS 蛋白表达的变化, 探讨环境汞污染对机体潜在危害, 并尝试应用即刻早期基因表达变化早期预报汞神经毒性的可行性, 以便应用 c-FOS 蛋白表达来早期预测环境汞污染对学习记忆的影响; 同时为卫生安全标准的制定及疾病的预防提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 实验动物 实验动物选用 Sprague-Dawley (SD) 健康大鼠, 体重 150g ± 5g, 购于中科院上海实验动物中心。

(2) 实验粮食 本实验所用粮食分别采自贵州省万山矿区实验田粮食和贵州清镇化工厂附近实验田粮食。

(3) 主要试剂和仪器 兔抗鼠 FOS 多克隆抗体; SP-kit(抗兔) 即过氧化物酶标记的链酶卵白素染色试剂盒, 含生物素化 IgG 及 S-A/HRP, DAB-Kit; 均购于美国 Santa Cruz 公司。倒置显微镜

收稿日期: 2004-03-17; 修订日期: 2004-06-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20177013); 上海交通大学 985 工程资助项目(113516001)

作者简介: 程金平(1973~), 男, 博士, 讲师, 主要从事环境化学和生态毒理学方面研究。

(Leica),石蜡切片机(德国 Leitz 1515 型),显微数码照相系统(日本 Nikon) , I MS 细胞图象分析系统(Tanon) ; Millipore 公司 Milli Q 型纯水仪 ,Heto DNA mini 真空干燥仪 ,eppendorf 移液器 ,CEI 021 分光光度计 ,Gis- 2008 图象分析系统(Tanon 公司) , AMA 254- Automatic solid/ liquid Hg Analyzer(Milestone , Italy) .

1. 2 方法

(1) 动物饲喂 动物买回适应 7 d 后开始饲喂 . 温度为 24℃ ± 1℃ ,室内光线按亮/ 暗 12 h 循环 ,自由取食 . 30 只大鼠分为 20 d 组和 30 d 组 2 大组 ,每组又分为对照组、清镇化工厂组和万山矿山组 3 组 ,每组 7 只 . 对照组喂以上海市场购买当年产大米 ,化工厂组喂以清镇化工厂地区实验田中产的大米 ,矿山组喂以贵州万山矿山实验田中产的大米 . 维生素、矿物油和无机盐离子也加入米饭中^[7] . 每只大鼠自由进食 ,每日更新 . 大鼠每隔 1 天于早晨 09 : 00 称重 1 次 ,开始喂养前 1 天记为第 0 天 ,以后依次类推 . 大鼠分别于喂养 20 d 和 30 d 后处死 .

(2) 取材 SD 大鼠达到饲喂时间后 ,股动脉取血处死 . 在冰盘内迅速除去大鼠脑颅骨 ,剥离硬脑膜及软脑膜 ,取出完整的脑组织 . 取 200 mg 组织快置 4℃ 的 4 % 多聚甲醛(用 0. 1 mol/ L PBS 配制、PH 7. 4) 100 mL 中固定 24 h . 固定后的组织经过 : 冲水、脱水、透明、浸蜡、包埋后矢状方向切片(片厚 5 μ m) ,每只大鼠脑组织切片 6 块 ,其中一块进行常规 HE 染色 ,另 5 张进行 FOS 免疫组化染色 .

(3) 免疫组化检测 切片常规脱蜡至水 ;加 3 % H₂O₂- 甲醇室温作用 30 min ,灭活内源性酶 ; PBS 洗 3 × 2 min ;置柠檬酸缓冲液中 ,微波炉加热 ;加抗原修复液 ,37℃ 20 min , PBS 洗 3 × 2 min ;加正常山羊血清 ,37℃ 20 min ,甩去多余液体不洗 ;加 FOS 一抗 ,4℃ 过夜 , PBS 洗 3 × 3 min ;加生物素化山羊二抗 ,37℃ 20 min , PBS 洗 3 × 2 min ;加 S- A/ HRP ,37℃ 20 min , PBS 洗 4 × 5 min ;加新鲜配制 DAB 显色 ,镜下控制反应时间 ;苏木素复染 ,双蒸水洗涤 ,常规梯度酒精脱水 ,二甲苯透明 ,中性树胶封片 .

(4) 结果判断 免疫组化染色切片与相应 HE 染色切片对照观察 ,大鼠海马部位参照包新民等著《大鼠脑立体定位图谱》辨认 . 以 FOS 阳性的癫痫大鼠脑组织切片为阳性对照 ;以正常山羊血清代替 FOS 一抗作为替代对照 ;以 0. 01 mol/ L PBS (pH 7. 4) 代替 FOS 一抗作为空白对照 .

(5) 显微数码照相及图象分析 用日本 Nikon

显微照相系统 ,选择适当部位 ,200 × 数码照相 . 每只大鼠 FOS 染色各取 5 张切片 ,每张切片观察 5 个视野 . 视场面积为 73 000 μ m² ,测定阳性细胞个数(*n*) .

(6) 统计分析^[8-10] 数据统计采用 *t* 检验 ,各组数据均取 $\bar{x} \pm S$

2 结果

2. 1 粮食中 Hg 和 Se 含量分析

本实验所用粮食分别采自贵州省万山姚家和清镇化工厂附近种植的粮食 . 根据合作单位所提供的资料 ,万山和清镇地区汞的污染情况不同 . 万山粮食中所含的汞以 HgCl₂ 为主 ,甲基汞只占 25. 2 % ,而清镇粮食中所含的汞以甲基汞为主 ,约占总汞含量的 83. 7 % . 另外 ,由于万山的矿主要是 Se 汞矿 , Se 的含量相当丰富 . 考虑到证实硒与汞的拮抗效应 ,本实验室分别测定了粮食中 Se 和汞的含量 ,结果见表 1 .

表 1 粮食中硒与汞的浓度/ mg· kg⁻¹

Table 1 The Se and Hg content of rice in different areas/ mg· kg ⁻¹			
元素	上海	万山	清镇
Hg	0. 004	0. 133	0. 155
Se	0. 050	0. 800	0. 075

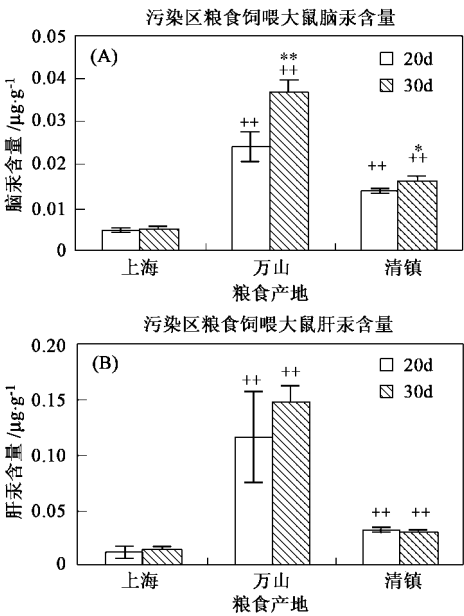
由表 1 可以得到各地区粮食中所含 Se 与 Hg 的摩尔比分别为 :对照地区 Se: Hg = 31. 76 ;万山矿区 Se: Hg = 15. 28 ;清镇化工厂 Se: Hg = 1. 19 ,接近 1 : 1 .

2. 2 大鼠饲喂污染粮食后脑和肝中汞蓄积

粮食饲喂 20 d 和 30 d 后 ,称取约 30 mg 的大鼠脑组织样品 ,放入样品舟内 ,由 AMA 254- Automatic solid/ liquid Hg Analyzer (Milestone , Italy) 自动完成 . 结果见图 1 .

由图 1 可以看出 ,饲喂 20 d 和 30 d 后 ,无论是万山组还是清镇组 ,脑汞含量均极显著的升高 (*p* < 0. 01) . 20 d 时 ,万山组脑汞含量是清镇组的 1. 75 倍 ,30 d 时 ,是清镇组的 2. 33 倍 ,万山组汞在脑中蓄积的速度显著大于清镇组 . 就各组本身而言 ,万山组 30 d 脑汞含量与 20 d 相比有极显著的增加 (*p* < 0. 01) ,清镇组 30 d 脑汞含量与 20 d 相比有显著的增加(*p* < 0. 05) . 对于肝组织 ,饲喂 20 d 和 30 d 后 ,无论是万山组还是清镇组 ,肝汞含量均极显著的升高 (*p* < 0. 01) . 20 d 时 ,万山组肝汞含量是清镇组的 3. 65 倍 ,30 d 时 ,是清镇组的 5. 09 倍 ,万山组汞在肝中蓄积的速度显著大于清镇组 . 就各组本身而言 ,万山组 30 d 肝汞含量与 20 d 相比有增加趋势 ,但

没有显著性差异,清镇组 30d 肝汞含量与 20d 相比略微降低,也没有显著差异.



[$n = 5, \bar{x} \pm S$, 图中 + 表示与对照相比,汞含量显著升高 ($p < 0.05$), ++ 表示与对照相比,汞含量极显著升高 ($p < 0.01$); * 表示同一粮食组饲喂 30d 与 20d 相比有显著差异 ($p < 0.05$), ** 表示同一粮食组饲喂 30d 与 20d 相比有极显著差异 ($p < 0.01$)].

图 1 大鼠脑和肝组织总汞含量

Fig.1 The total mercury concentrations in brain and liver

2.3 粮食饲喂后大鼠海马 c-FOS 蛋白表达的影响

在图象分析系统下,测定各组 c-FOS 表达阳性细胞个数,结果见表 2.

表 2 粮食饲喂后大鼠海马 c-FOS 蛋白表达¹⁾

Table 2 Number of FOS-positive cells in hippocampus exposure to rice

污染源	饲喂时间/d	
	20d	30d
对照组	10.3 ± 6.7	15.6 ± 6.9
清镇化工厂	47.6 ± 11.2 ²⁾	50.3 ± 9.6 ²⁾
万山汞矿	43.4 ± 10.5 ²⁾	52.6 ± 11.3 ²⁾

1) 阳性对照组即上海粮食中加 $HgCl_2$ 组饲喂 20d 后,大鼠海马 c-FOS 阳性细胞数均值为 61.3. 与对照组相比,2) $p < 0.01$;数据统计采用 t 检验,各组数据均取 $\bar{x} \pm S$ 表示, $n = 5$.

清镇化工厂大米和万山矿区大米饲喂 20d 和 30d 与对照组上海大米相比大鼠海马 c-FOS 蛋白表达均具有显著性差异 ($p < 0.05$, $p < 0.01$);无论是化工厂大米还是矿区大米饲喂 30d 和饲喂 20d 相比大鼠海马 c-FOS 蛋白表达均没有显著性差异;这说明实验田大米能够极显著诱导大鼠海马 c-FOS 蛋白表达,并随着时间的延长表达稳定在高水平,这种表达是持续性的表达.

3 讨论

实验粮食饲喂 20d 和 30d,大鼠脑中汞的含量均显著高于对照组 ($p < 0.01$);实验粮食饲喂 30d 脑中总汞含量比饲喂 20d 显著增加 ($p < 0.05$);这是由于粮食中汞含量高所致,汞随米饭一起进入体内,而汞在体内的排泄速度又缓慢,脑中总汞半减期为 180 ~ 240d,当大鼠食用含高汞的米饭时,汞就在体内尤其是脑中蓄积.万山矿区粮食饲喂 20d 脑中总汞含量是清镇化工厂粮食饲喂脑汞含量的 1.75 倍,30d 时是 2.33 倍(图 1),而矿区粮食总汞含量是 0.133 mg/kg 反而比化工厂粮食总汞含量 0.155 mg/kg 低(表 1);这可能是由于各粮食中硒汞摩尔比不一样,矿区 $Se: Hg = 15.28$,化工厂为 $Se: Hg = 1.19$,即化工厂硒汞摩尔比更接近于 1.这说明,当硒汞摩尔比接近于 1 时,Se 可以更大程度降低汞在体内的蓄积水平.

3 组粮食饲喂 20d 和 30d,大鼠体重的变化趋势为:清镇化工厂组 > 万山矿区组 > 上海对照组;在个体水平上这 3 组大鼠均没有异常的变化,通过免疫组化检测得出大鼠在汞污染地区粮食饲喂后与对照组相比大鼠海马 c-FOS 蛋白表达极显著增加并呈上升的趋势(表 2).这从基因水平上说明实验田中的粮食对人来讲应该慎食用,而从检测实验田粮食汞的浓度也发现,其汞含量超标.

本实验采用免疫组化方法,在翻译水平上检测粮食饲喂后大鼠脑 c-fos 基因的表达.通过免疫组化研究发现,实地粮食能够诱导大鼠脑海马 c-FOS 蛋白表达,实验田粮食饲喂 20d 和 30d 大鼠海马 c-FOS 蛋白表达与对照组相比均显著增加.表明这种表达是持续性的表达,适度的 c-fos 表达参与 DNA 损伤与修复,包括细胞周期调控,对受损细胞有保护功能,而不适当的表达将干预细胞核的修复功能而使细胞走向凋亡.已有证据显示^[11~13],c-fos 的持续表达在细胞形态学死亡前数小时或数天即开始,这似乎可作为细胞的终末分化的标记及死亡的先兆,而本课题组通过在上海粮食中加入 MMC 以模拟清镇化工厂粮食对大鼠进行 20d 饲喂,研究也发现该组中出现了肝肿大病变.目前对 c-fos 在细胞凋亡中的作用有如下认识^[14]: c-fos 的表达与细胞凋亡有必然的联系,它终断了细胞内信号的传导而诱导凋亡,并产生死亡因子;通向凋亡信号通路中有 c-fos 及其它 IEGs 的表达;在一些情况下, c-fos 产物是引导细胞死亡的基因调节通路中的一个必需成分.

Smeyne 等通过研究发现^[15]:癫痫后大鼠海马 cAl 和 cA3 区等部位出现神经元凋亡,而在此之前即刻早期基因尤其是 c-fos 长时间强烈表达.

结合本课题组神经递质方面研究发现^[16],实地粮食对大鼠神经递质影响实验结果可以看到,实地粮食引起了大鼠体内各组织:脑、血、肝、肾中神经递质 ACh、NO 及其相关酶类的显著变化,饲喂 30d 与 20d 相比,实地汞污染粮食组大鼠体内各指标的改变都有不同程度的回落;自由基方面的研究发现^[17],化工厂粮食连续饲喂后,20d 时 MDA 含量就上升,表现出明显的氧化损伤,30d 时 MDA 含量又逐渐恢复;而矿区粮食饲喂,大鼠在 20d 和 30d 时体内各氧化指标均未表现出明显变化.从汞含量分析可以发现,实验粮食饲喂 30d 脑中总汞含量比 20d 显著增加($p < 0.05$),也就是随着饲喂时间的增加汞的蓄积越来越多,所以毒性也就越来越大,而只有即刻早期基因一直维持在高水平表达,神经递质和氧化损伤都有不同程度的恢复,所以即刻早期基因表达变化更能反应汞的神经毒性.提示我们应用即刻早期基因 c-fos 表达特征对汞污染地区进行预报和评价是可行的.

参考文献:

[1] Tan H, He J L, Liang L, Lazoff S, Sommer J, Xiao Z F, Lindqvist O. Atmospheric mercury deposition in Guizhou, China[J]. The Science of the Total Environment, 2000, **259**(1 ~ 3): 223 ~ 230.

[2] Xiao Z F, Sommar J, Lindqvist O, Hong T, He J L. Atmospheric mercury deposition on Fanjing Mountain Nature Reserve, Guizhou, China[J]. Chemosphere, 1998, **36**(10): 2191 ~ 2200.

[3] Feng X. Mercury in coal of Guizhou China and its environmental impacts[J]. Fuel and Energy Abstracts, 2002, **43**(4): 289.

[4] Feng X, Hong Y. Modes of occurrence of mercury in coals from Guizhou, People's Republic of China[J]. Fuel, 1999, **78**(10): 1181 ~ 1188.

[5] Horvat M, Nolde N, Fajon V, Jereb V, Logar M, Lojen S. Total mercury, methylmercury and selenium in mercury pollut-

ed areas in the province Guizhou, China[J]. The Science of the Total Environment, 2003, **304**(1 ~ 3): 231 ~ 256.

[6] 丁振华,王文华,瞿丽雅,汤庆合,等. 贵州汞污染环境效应及其对生态系统影响[J]. 环境科学, 2004, **25**(2): 111 ~ 114.

[7] Sem' ramis M A, Domenea H R, Torin J A. Dietary zinc improves and calcium depresses growth and zinc uptake in rats fed rice bran[J]. Nutrition Research, 2001, **21**: 1493 ~ 1500.

[8] 程金平,王文华,贾金平. 氯化甲基汞对大鼠脑 c-fos、c-jun 基因表达的影响[J]. 环境科学, 2003, **24**(1): 52 ~ 56.

[9] Jiang Q, Gu Z L, Zhang G Y. Activation, involvement and nuclear translocation of c-Jun N-terminal protein kinase 1 and 2 in glutamate-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons[J]. Brain Research, 2002, **956**(2): 194 ~ 201.

[10] 程金平,王文华,瞿丽雅,贾金平,等. 甲基汞对大鼠脑即刻早期基因 c-Jun mRNA 表达影响[J]. 环境科学, 2004, **25**(4): 159 ~ 162.

[11] Ma W Y, Quirion R. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus[J]. Pain, **99**(1 ~ 2): 175 ~ 184.

[12] Matsuoka M, Igisu H. Activation of c-Jun NH₂-Terminal Kinase (JNK/SAPK) in LLC-PK₁ Cells by Cadmium[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998, **251**(2): 527 ~ 532.

[13] Son M H, Kang K W, Lee C H, Kim S G. Potentiation of cadmium-induced cytotoxicity by sulfur amino acid deprivation through activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) in conjunction with p38 kinase or c-jun N-terminal kinase (JNK): Complete inhibition of the potentiated toxicity by U0126 and ERK1/2 and p38 kinase inhibitor[J]. Biochemical Pharmacology, 2001, **62**(10): 1379 ~ 1390.

[14] Hu L, Hatano M, Ruther U. Over-expression of c-fos induces apoptosis of CD⁴³⁺ pro-B cells[J]. J Immunol, 1996, **157**(9): 3804 ~ 3811.

[15] Smeyne K J, Vendrell M, Harward M. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo[J]. Nature, 1993, **363**: 166 ~ 169.

[16] 杨柳. 环境汞污染对动物某些神经递质影响的研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士论文, 2003.

[17] 胡卫萱. 环境汞污染对动物氧化损伤影响的研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士论文, 2003.